

## Gas-chromatography에 의한 핵산鹽基成分의 分析

朴 萬 基 · 白 南 豪

(Received March 19, 1974)

Man Ki Park and Nam Ho Baik: Analysis of  
Nucleic Acid Components by Gas Chromatography

1869年 Miescher에 의하여 "Nuclein"이라고 命名된 以來 1940年代 chromatography의 分離, 分析이 利用될 때까지는 거의 古典的인 銀鹽, 銅鹽等 沈澱法이<sup>1)</sup> 利用되었다. 1947年 Vischer와 Chargaff에 의하여 濾紙 chromatograph<sup>2)</sup>가 應用되기 始作했으며 其後 各種 chromatography가 널리 有力한 分離分析法으로 利用되어 왔다.

向流分配法<sup>3-5)</sup>, column chromatography<sup>6)</sup>, ion exchange chromatography,<sup>7)</sup> 薄層 chromatography,<sup>8)</sup> 電氣泳動法<sup>9)</sup> 등이 利用되어 왔다.

核酸成分이 不揮發性物質이며 또한 核酸의 鹽基成分이나 nucleoside, nuclotide 등 모두 極性이 강한 物質들이어서 gas chromatography(GC)에 별로 應用을 못하였으나, 最近 試料의 處理 및 GC法의 分配劑의 發達에 依하여 점차 많이 利用되고 있다. 最初에 核酸 成分을 GC法에 應用한 것은 1962年 Miles<sup>10)</sup>로 알려져 있다. Nucleoside를 acetyl化, methyl acetone 誘導體로 分析을 시도한바, adenosine, uridine系列에는 分離에 成功했으나 guanine과 cytidine系는 分離되지 않았다. MacGee<sup>11,12)</sup>는 purine 또는 pyrimidine鹽基를 methyl 化하여 分離하였다. 其後 trimethyl silylating reagent(TMS化劑)의 應用이 發展하여 TMS化에 依한 核酸 成分의 GC法 研究가 시작되었다. 1965年 Hancock는 TMS化에 依하여 nucleoside,<sup>13)</sup> adenosine誘導體<sup>14)</sup>를 GC法에 應用했으며, 1966年 Hashizume는 nucleotide,<sup>15)</sup> 鹽基<sup>16)</sup>의 分析 및 定量的인 鹽基 組成 分析에<sup>17,18)</sup> 應用하였다. 그러나 cytidylic acid<sup>19)</sup>가 分析이 잘 안되며 cytidine의 定量性이 나쁘고 pseudouridine의 定量이 안되어 分析 條件에 따라 各 化合物의 Mol感도가 變化한다는 것이 단점으로 나타났다. Gehrke<sup>20-22)</sup>는 核酸 成分中 purine과 pyrimidine誘導體의 鹽基 成分을 주로 실시했으며 RNA, DNA의 가수 분해 物질을 BSA, BSTFA등으로 TMS化하여, 내부 표준 物질로 phenanthrene을 사용, 상대 物 感도比 (RMR : relative molar response)로 좋은 定量 結果를 얻고 있다. 그러나 역시 cytosine의 peak가 두개로 갈라지고 있는 것은 解決을 못하고 있다.

From the Department of Pharmaceutical Analysis, College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul, Korea.

著者が 있던 研究室에서는 이 두개의 peak에 對하여 연구 발표<sup>23)</sup>를 했으나 아직 출판증에 있다. 특히 内部 標準 物質로써 barbituric acid를 使用하여 phenanthrene에 비하여 몇 가지 이점을 얻게 된다. Phenanthrene의 순품 정제가 곤란한데 비하여 barbituric acid는 合成 정제가 간단하며 phenanthrene은 TMS와 反應性이 많기 때문에 核酸의 鹽基成分과 TMS의 反應정도를 測定할 수가 없으나 barbituric acid는 직접 反應을 함으로 反應에 관한 比較 標準이 될 수 있고 gas chromatogram상에서는 中間位置에 나타난다는 長點을 갖고 있다. 以上과 같이 核酸의 成分을 GC法에 依하여 分離 分析 및 定量法은 몇 년 사이에 급진적인 發展을 거듭하고 있으며 미량 成分의 분석에도 많이 응용될 것으로 예상된다.

**TMS 誘導體—核酸 成分의 GC法**은 核酸 成分에 —OH, —NH<sub>2</sub>, —NH基 등의 강한 極性基를 가지고 있거나 不揮發性때문에 그대로의 分離는 거의 不可能하였으나 최근에는 TMS 化劑에 依하여 極性도 감소하고 揮發性도 增加하는 유도체로 되어 核酸成分의 GC法을 용이하게 應用할 수 있게 되었다.

일반적으로 —OH, —NH<sub>2</sub>, —NH, —SH基를 가진 物質, 즉 糖,<sup>24)</sup> alcohol,<sup>25)</sup> phenol,<sup>26)</sup> steroid,<sup>27)</sup> amino acid, peptide,<sup>29)</sup> nucleic acid, carboxylic acid,<sup>30)</sup> 등이 TMS化劑 試藥에 依하여 ether化 또는 ester化하여 熱에 安定한 (300°정도로 熱分解는 없음) 揮發性 化合物이 生成된다. 이 TMS誘導體는 加水分解를 받으면 容易하게 본래의 化合物로 되돌아 가는 특징도 가지고 있다.

이 유도체가 定量的으로 進行된다는 사실은 1952년 경부터 알려져 있으나<sup>31-34)</sup> 이 方法이 G.C.에 應用되기 始作한 것은 1958년경에야 phenol성 化合物의 分析에서 始作되었고 그 후 糖, amino acid, steroid, carboxylic acid등에 應用이 되었다.

TMS化劑만 하여도 그 種類가 점차 많아지고 그 應用度가 점점 높아지고 있는 실정이다. 보통은 trimethyl silyl chloride (TMSC)와 hexamethyldisilazane (HMDS)이 많이 使用되었으나 차차 N, O-bis(trimethylsilyl)acetamide (BSA) 또는 N, O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA)등이 많이 사용되고 있는 실정이다. 最近에는 GC法 試藥용으로 TMS 化劑를 적당한 용매에 미리 넣어서 市販되는 것도 있고 TMS-HT와 같이 TMSC와 HMDS의 혼합물을 pyridine의 溶液상태로 市販하는 것도 있다.

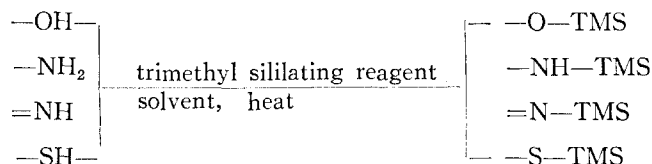
核酸 成分의 TMS化劑로 最近 反應性이 좋은 BSA나 BSTFA를 주로 사용하고 있으며 특수한 경우에는 TMSC등을 섞어 쓰는 경우도 있다. 反應條件은 核酸의 鹽基成分을 건조하여 無水物 상태로 하고 無水 pyridine 溶媒에 녹인 후 TMS化劑를 50~100mole 초과량을 넣고 油浴상에서 150°C 약 1시간 정도면 定量的으로 進行된다.

著者が 사용한 경우는 다음과 같다.

Procedure for GLC determination of base components, Dried sample (nucleic acid hydrolysates); 100 mcg~1mg, pyridine or acetonitrile; 50 $\mu$ l, Silylating reagent(BSA or

BSTFA); 50 $\mu$ l. The mixture in a test tube was sealed and heated on a oil bath (150°) for 45 min. \* 100 molar excess of BSA to total bases.

反應生成物은 거의 알려져 있는 상태로 uracil인 경우 2,4-di-O-TMS uracil<sup>16)</sup>로 알려져 있고 guanine인 경우 2,9-di-N-6-O-TMS guanine,<sup>35)</sup> adenine은 6,9-di-N-TMS adenine등의 유도체가 생성된다. GC法에서 이러한 物質들은 單一 peak로써 定量的으로 나타나게 된다. 즉 다음과 같이 要約할 수가 있다.



分離—核酸 成分의 TMS誘導體는 沸點이 많이 變함으로 昇溫 分析이 必要하다. 鹽基의 TMS誘導體는 column 온도가 120°~220°정도이며 nucleoside의 TMS誘導體는 220°~240°, nucleotide는 240°~260°로 column-온도를 해 주면 거의 分析이 가능하다. 물론 column의 種類, 충전劑의 種類, 擔體의 種類 등에 따라 差가 생기게 된다.

著者의 경우는 주로 boron silicate glass column 3mm $\phi$ ×1m를 使用하였으며 특히 미량 成分을 研究할 때는 glass column이 더 有利할 것으로 생각된다. 충전劑(液相分配劑)로써는 silicon oil 또는 silicon grease로 methyl silicon系(SE-30, OV-1), apiezon grease을 쓰는 例도 있다.

著者는 주로 OV-1, OV-17을 使用하였다. 擔體도 最近에는 均질 bead로 된 合成品 등이 使用되고 있으나 高價인 관계상 아직도 均조트를 적당히 처리하여 均질하게 된 것을 使用하고 있는 實情이다. 著者는 주로 gas chrom. Q (80~100 mesh)나 chromosorb W or G (80~100mesh)를 使用하였다. Gas chromatograph장치에 檢出器도 여러가지 형태로 發展變化하고 있으나 核酸 成分을 TMS誘導體로 分離, 檢出할 때는 주로 F.I.D.(flame ionization detector)가 使用되고 있으며, 一般의 有機化合物과는 달라서 가끔 F.I.D.에 부착되는 백색의 SiO<sub>2</sub>를 소제하여야 한다는 不便이 있다. F.I.D.로써 檢出 限界는 각 核酸鹽基에 대하여 約3×10<sup>-11</sup>mde<sup>20)</sup>로 發表되고 있다. 其外 檢出器로 T.C.D.(thermal conductivity detector), H.W.D.(hot wire detector)를 使用한 例도 있다. 어느 쪽이나 定量性이 나타나고 있으나 F.I.D.쪽이 感度높은 結果로 알려져 있다.

以上과 같은 여러 條件中에서 充填劑만 다르게 하면 保持時間의 差로 化合物의 同定이 可能하게 된다.

一般的으로 column의 溫度가 높으면 예리한 peak가 나타나나 分離는 不良해지며, column

낮으면 分離는 良好해지나 peak가 넓게 둔한 상태로 나타난다. 심한 경우에는 peak가 나타나지 않는 경우도 있다. 특히 T.M.S.誘導體를 G.L.C.에 注入時는 미리 column을 T.M.S. 化劑로 2~3回 注入하여 예비처리를 하여 不活性化 시킨 후 使用하는 것이 좋다.

**Table I—** Relative retention time of TMS derivatives of nucleic acid (liquid phase, DC 430).

Column temperature	150	180	230	250
Flow rate (ml/min)	60	60	50	50
Uracil	0.08	0.12		
Thymine	0.11	0.15		
Cytosine	0.20	0.21		
5-Methyl cytosine	0.22	0.26		
Orotic acid	0.64	0.63		
Purine	0.18	0.25		
Hypoxanthine		0.84		
Adenine	1.00 (a)	1.00 (b)	1.00 (c)	1.00 (d)
Theophylline		1.19	1.36	
3-Methyl eanthine		1.56		
Xanthine		2.02	1.70	
Guanine		2.86	2.16	
Uric acid		3.30	2.36	
Deoxyuridine			5.21	5.43
Thymidine			5.65	5.97
Deoxyadenosine			9.88	9.66
Deoxy guanosine			17.48	16.51
Nebularine			5.21	5.54
Uridine			7.06	7.07
Cytidine				18.6
Inosine			10.32	9.99
Adenosine			10.86	10.86
Xanthosine			14.99	13.79
Guanosine			18.24	16.83
3'-UMP				19.22
3'-AMP				28.25
3'-GMP				42.35
UMP				23.24
IMP				33.45
AMP				37.03
GMP				49.74
dUMP				19.87
dAMP				35.51
THP				21.07

Retention time of adenine: (a) 23.0 min, (b) 5.8 min, (c) 1.03 min, (d) 0.48 min

Column: 5% DC 430, Celite545, 60-80 mesh

T. Hashizume<sup>19)</sup>는 silicon DC 430과 apiezon 을 사용하여 核酸成分의 T.M.S.誘導體의 保持時間을 조사한 예가 있다. Table I, Table II,의 T. Hashizume의 경우는 항온에서 각 充填劑에 대하여 保持時間을 表示한데 비하여 Gerke<sup>20)</sup>는 昇溫下에서 核酸成分의 T.M.S.誘導體를 保持溫度로 表示하고 있다. (Table III, Fig. I)

**Table II-** Relative retention time of TMS derivatives of nucleic acid component (liquid phase, apiezon L).

Column temperature (°C)	180	230	240
Flow rate (ml/min)	80	69	78
Uracil	0.07		
Thymine	0.10		
Cytosine	0.18		
5-Methyl cytosine	0.20		
Orotic acid	0.43		
Purine	0.23		
Hypoxanthine	0.74		
Adenine	1.00 (a)	1.00 (b)	1.00 (c)
Theophyine	1.52		
Xanthine	1.60		
Guanine	2.69	2.04	
Uric acid	2.47		
Deoxyuridine		4.23	
Thymidine		4.85	
Deoxyadenosine		10.50	
Deoxyguanosine		16.85	
Nebularine		3.80	3.71
Uridine		4.73	4.6
Cytidine		15.54	13.2
Inosine		7.08	6.7
Adenosine		8.62	8.6
Xanthosine		9.12	8.3
Guanosine		13.15	12.1
3'-UMP			9.74
3'-AMP			17.24
3'-GMP			24.39
UMP			13.01
IMP			19.56
AMP			23.7
GMP			26.81
TMP			13.27

Retention time of adenine: (a) 10.4 min, (b) 1.3 min, (c) 0.82 min Column: 5% apiezon L, Celite 545, 60-80 mesh

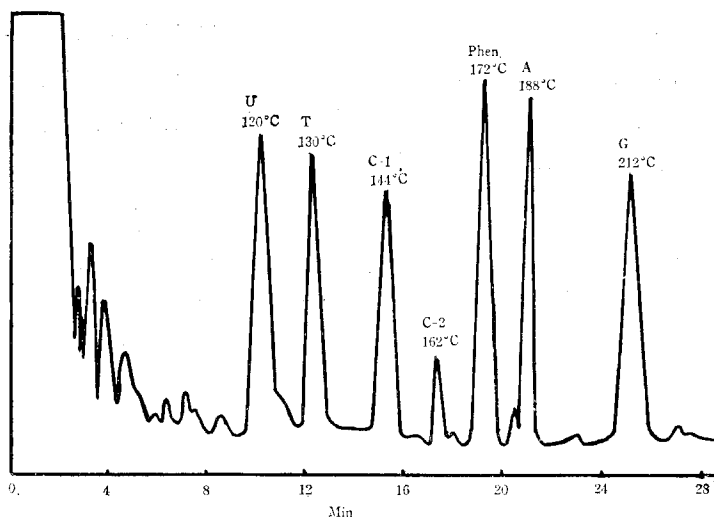


Fig. 1- Chromatographic conditions: 7.5° ( $\mu$ l)/min temp. program from 90°  $\mu$ g to 200° with a delay of 4 min; Flash temp. 260°

Attenuation, 10 $\times$ S. Column: 1m $\times$ 4mm I.D. Pyrex, 10% SE-30 on Supelcoport (100-200 mesh). Silylation conditions: 10 each in reaction vial; 100  $\mu$ l BSTFA; 100  $\mu$ l acetonitrile; at 150° for 15 min; 4 mcl (ca. 200ng of each base) were injected.

Table III—Relative molar response of the TMS derivative of purine and pyrimidine bases using a FID<sup>a</sup>.

Compound	Retention temperature	RMR <sup>b</sup>	S.D. <sup>c</sup>
Uracil	120	0.67	0.010
Thymine	130	0.68	0.012
Purine	140	0.38	
Cytosine	148; 161	0.54	
5-Methyl cytosine	152; 165	0.45	
Hypoxanthine	176	0.58	
Adenine	185	0.60	0.004
Xanthine	202	0.71	
Guanine	211	0.72	0.006
Phenanthrene, IS.	172	1.00	

Chromatographic condition; Boronsilicate column 1 m $\times$ 4mm 4% SE-30, Chromosorb G 60-80 mesh  
Column temperature: 95° $\rightarrow$ (6.7°/min) increase

Carrier gas: N<sub>2</sub> gas 80 ml/ml/min

Injection temperature; 80°

Detector temperature: 25° (FID)

組成 分析—核酸 成分의 組成을 決定하는 데는 定性的인 意味와 定量的인 意味가 있을 수 있다. 定性的인 意味로는 앞에서 기술한 바와 같이 分離가 가장 重要한 요인이며 또한 어떤 成分인가를 알아내야만 한다. GC에서는 주로 標準品과 比較하여 保持時間이나 保持溫度

로써 同定하는 것이 많았으나 최근에는 GC와 他 機器分析和 연결되어 직접 確認하는 方法이 점차 많아지고 있다. GC와 IR<sup>37)</sup> 또는 GC와 Mass<sup>38)</sup>, GC-NMR<sup>37)</sup> 등은 未知 核酸成分의 T.M.S.誘導體의 構造를 決定하는데 絶對的인 力을 發揮하고 있다. 특히 GC-Mass같은 경우는 gas chromatogram상 完全 分離가 안되었을 경우에도 아주 짧은 時間에 정점 부근만을 測定可能한 것이 特徵이라 하겠다.

그러나 定量的으로 確認을 못할 경우에는 正確한 組成을 알 수 없는 것이다. GC法이 발달하기 이전의 方法 또는 現在 병용하고 있는 方法으로써는 核酸成分을 鹽基나 nucleoside 또는 nucleotide 등의 低分子로 하여 元素分析이나 기타 PPC., TLC, ion exchanger, electrophoresis로 分離한 後 吸光度法이나<sup>39-41)</sup> 融解溫度 測定法<sup>42)</sup> 또는 電子計算機를 利用하는 法<sup>43)</sup> 등을 使用하여 定量 操作을 하고 있다. 이 어느 것이나 GC法에 比하면 操作이 複雜하고, 分離後 別度로 定量 操作을 하여야 하나, GC法은 定量 操作을 따로 할 필요 없이 직접 가능하다는 점에서 有利하다.

그러나 核酸을 加水分解하는 操作 方法에 따라서 成分과 量, 즉 組成도 달라질 수 있다는 점이다. 過鹽素酸 分解時 加水分解가 定量的으로 進行된다고<sup>44)</sup> 보고되어 있고 또 가장 많이 쓰이고 있으나, 微量 成分 취급시는 오히려 enzyme<sup>45)</sup>을 使用하는 方法이 最近에는 많이 利用되고 있다. 主成分만을 취급시에는 아직도 過鹽素酸法이 번용되고 있다.

著者は sample 1mg(S-RNA)에 70% HClO<sub>4</sub> 1ml을 加하고 沸騰水浴上에서 1時間 加水分解시킨 後 8M의 KOH溶液으로 냉각하면서 中和시키고 遠心分離하여 상등액을 ion exchanger(formate type, 100~200 mesh, dowex 1×2)에 吸着시키고 증류수로 수세한 후 1M HCOOH로 용출시켜 내었다. 용출된 液을 rotary evaporator로 건조한 후 silylating agent (BSA)로 T.M.S.誘導體를 만들어 GC에 注入했다.

GC法에서는 定量 計算時 面積強度로 하는 方法이 대부분이며 그중에서도 重量으로 秤量하는 法이 가장 간편한 方法으로 利用된다. 그러나 GC法에서는 일정한 條件을 유지시키거나 同一量의 試料注入이 거의 不可能하므로 內部標準物質에 대한 相對值로 計算을 하게 된다.

Gerke나 T. Hashizume는 內部표준물질로 phenanthrene을 使用해 왔으나 前述한 바와 같이 著者は H. Yuki가 시도하는 barbituric acid를 使用하여 왔다. 計算時 相對 物 感度 比는 다음과 같이 구한다.

$$\text{RMR}_{B/I.S.} = \frac{\frac{\text{Area}_B}{\text{Grams}_B / \text{M.W.}_B}}{\frac{\text{Area}_{I.S.}}{\text{Grams}_{I.S.} / \text{M.W.}_{I.S.}}} = \frac{\frac{\text{Area}_B}{\text{Moles}_B}}{\frac{\text{Area}_{I.S.}}{\text{Mole}_{I.S.}}}$$

RMR; relative molar response

Area<sub>B</sub>; area chromatographic peak for the base

Area I-s; area chromatographic peak for internal standard

M.W.; molecular weight

즉 内部標準物質에 대한 기지물질로 미리 RMR을 구해둔다면 그 다음부터는 内部標準物과 RMR로 부터 未知濃度를 算出할 수가 있다. 또한 試料注入時의 오차도 막을 수가 있다.

以上과 같은 方法에 의한 核酸成分의 TMS誘導體와 内部標準物質과의 RMR을 본다면 Fig. 2, Table IV와 같다.

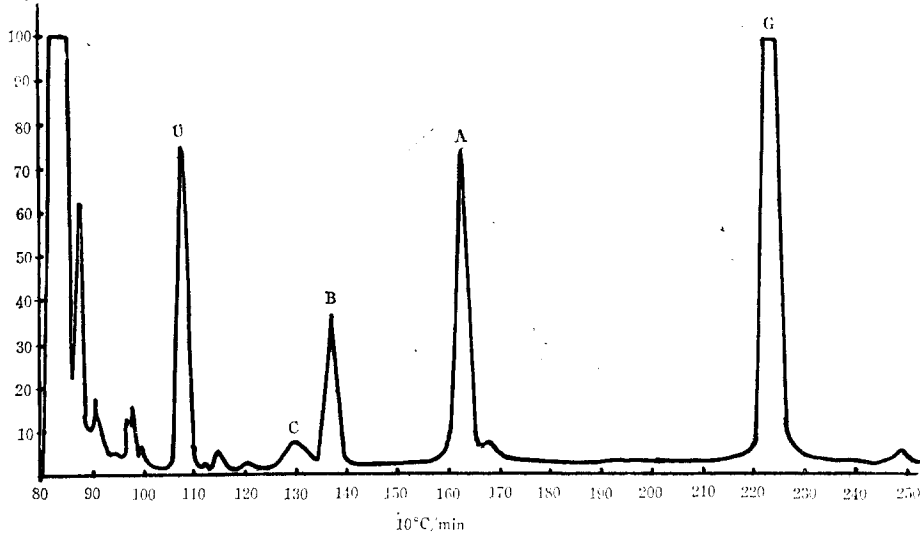


Fig. 2.—Analysis of the purine and pyrimidine base in the yeast s-RNA.

Column: Boronsilicate glass 3 mm×1m 3% OV-1, Gaschrom Q, 80—100 mesh

Oven: 80°—260° (10°/min)

Injection: 250°—300°

Detector: FID Carrier gas 40—60 ml/min

Table IV— RMR of the TMS-Derivatives of purine and pyrimidine base.

Compound	Retention temperature	RMR
Uracil	106°C (120)	0.575 (0.67)
Thymine	116°C (130)	0.493 (0.68)
Cytosine	128°C (148)	0.346 (0.54)
Adenine	161°C (185)	0.310 (0.60)
Guanine	222°C (211)	0.342 (0.72)
Barbituric acid	135°C (—)	1.00 (—)
Phenanthrene	— (172)	— (1.00)

核酸의 加水分解物質을 TMS誘導體로 만들어 GC에 注入時 成分 含量의 差가 많이 날 때 는 곤란한 경우가 있다. 즉 感度를 낮추면 微量成分이 검출되지 않고 感度를 높이면 多量 成分이 chart紙에 scale out이 되어 실지 計算이 不可能할 때가 있다. 이런 경우는 우선 選



擇的인 有機溶媒 抽出을 利用하던가 아니면 溶解度差가 큰 溶媒를 몇 번 反復抽出에 의하여 微量成分의 濃度를 相對的으로 높일 수가 있다.

또한 GC上에서도 計算에 의하여 可能하다. (Fig. 3, Table V)

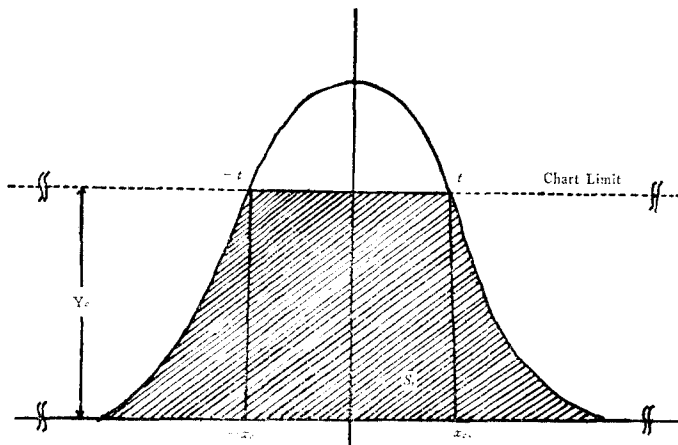


Fig. 3—Off-chart chromatographic peak.

Table V—The relative values of  $\beta$  and K.

$\beta$	K	$\beta$	K	$\beta$	K
0.100	1.001	0.450	1.070	0.680	1.481
0.145	1.002	0.455	1.073	0.685	1.503
0.170	1.003	0.460	1.076	0.690	1.528
0.185	1.004	0.465	1.079	0.695	1.553
0.205	1.005	0.470	1.082	0.700	1.581
0.215	1.006	0.475	1.086	0.705	1.609
0.225	1.007	0.480	1.090	0.710	1.640
0.240	1.008	0.485	1.093	0.715	1.673
0.245	1.009	0.490	1.097	0.720	1.708
0.255	1.010	0.495	1.101	0.725	1.745
0.265	1.011	0.500	1.106	0.730	1.786
0.270	1.012	0.505	1.110	0.735	1.828
0.280	1.013	0.510	1.115	0.740	1.875
0.285	1.014	0.515	1.120	0.745	1.924
0.290	1.015	0.520	1.125	0.750	1.978
0.295	1.016	0.525	1.130	0.755	2.035
0.300	1.017	0.530	1.135	0.760	2.098
0.305	1.018	0.535	1.141	0.765	2.166
0.310	1.019	0.540	1.147	0.770	2.239
0.315	1.020	0.545	1.153	0.775	2.320
0.320	1.021	0.550	1.159	1.173	2.408
0.325	1.022	0.555	1.166	0.785	2.504
0.330	1.023	0.560	0.780	0.790	2.610

0.335	1.024	0.565	1.180	0.795	2.722
0.340	1.025	0.570	1.187	0.800	2.857
0.345	1.027	0.575	1.195	0.805	3.001
0.350	1.028	0.580	1.203	0.810	3.162
0.355	1.029	0.585	1.212	0.815	3.342
0.360	1.031	0.590	1.221	0.820	3.546
0.365	1.032	0.595	1.230	0.825	3.776
0.370	1.034	0.600	1.240	0.830	4.038
0.375	1.036	0.605	1.250	0.835	4.339
0.380	1.037	0.610	1.261	0.840	4.685
0.385	1.039	0.615	1.272	0.845	5.088
0.390	1.041	0.620	1.284	0.850	5.559
0.395	1.043	0.625	1.296	0.855	6.116
0.400	1.045	0.630	1.309	0.860	6.779
0.405	1.047	0.635	1.322	0.865	7.578
0.410	1.049	0.640	1.337	0.870	8.552
0.415	1.051	0.645	1.351	0.875	9.754
0.420	1.054	0.650	1.367	0.880	11.26
0.425	1.056	0.655	1.384	0.885	13.17
0.430	1.059	0.660	1.401	0.890	15.65
0.435	1.061	0.665	1.419	0.895	18.93
0.440	1.064	0.670	1.439	0.900	23.38
0.445	1.067	0.675	1.459		

$$K = S_f / S_r$$

$$\beta = \frac{2X_c \cdot Y_c}{S_r}$$

$$K = f(\beta) = \frac{\sqrt{2\pi}}{2te^{-t^2/2}} \beta$$

$S_f$  : 보이지 않는 부분까지 습한 완전한 모양의面積.

$S_r$  : 기록지에만 남은 부분의 면적. 즉 그림에서 사선을 친 부분의面積. (모든面積은 무게로써 代置하여 計算한다.)

$X_c$  : 中心線으로 부터 기록지의 상단의 절단된 部分까지의 거리.

$Y_c$  : 기록지의 폭.

計算의 順序는  $X_c$ 와  $Y_c$  및  $S_r$ 로 부터  $\beta$ 를 計算하고  $\beta$ 值로 부터 Table V에서  $K$ 值를 찾으면  $K = \frac{S_f}{S_r}$ 에서  $S_f$ 를 구하게 된다.

## 結 論

現在 GC法의 發展에 따라 거의 低分子 有機化合物이 GC法에 의하여 分析이 可能하게 되었으며, 高分子化合物이나 天然物質의 有機化合物中 加水分解에 의하여  $-OH$ ,  $-NH_2$ ,  $NH$ ,  $-SH$ 를 갖는 低分子物質로만 된다면 T.M.S.誘導體에 의하여 거의다가 GC

法으로 가능하다는 것을 암시해 주고 있다.

試料 처리 기술뿐만이 아니라 機器의 發達로 GC-Mass, GC-IR, GC-NMR 等の 組合에 의하여 標準物質없이도 GC로써 標造의 推定・決定이 可能해졌으며 더욱 전자계산기의 연결로 極度로 發展단계에 있다. 물론 核酸分析에 있어서는 pyro-gas chromatography<sup>49,50</sup>도 研究를 하고 있으나, 역시 加水分解에 의하여 TMS誘導體로 하여 GLC를 使用하는 편이 좋을 것으로 사료된다.

앞으로는 核酸中 微量成分의 分析에 研究가 집중될 것으로 추측되며, 이러한 경우는 加水分解도 酸이나 alkali등의 강력한 方法보다는 Enzyme을 利用하여 加水分解하는 편이 좋은 結果를 가져올 것으로 사료된다.

現在 GC法에 의한 感度는 核酸의 鹽基成分에 있어서는  $3 \times 10^{-11}$  mole이라고 하나 다른 機器의 感度に 비하면 상당히 높은 편이나 Avogadro數에 비하면 아직도 요원한 것 같다.

## 文 獻

1. H. S. Loring, in "The Nucleic Acids", Ed. by Chargaff & Davidson, Vol. I, Academic Press, 1955, p-199
2. E. Vischer and E. Chargaff, *J. Biol. Chem.* **168**, 781 (1947)
3. K. Randerath, *Angew. Chem.*, **73**, 439 (1961)
4. J. F. Tinker, G.B. Brown, *J. Biol. Chem.*, **173**, 585 (1948)
5. F. Weygand, A. Wacker and H. Dellweg, *Z. Naturforsch.*, **66**, 130 (1951)
6. S. More and W. H. Stein, *J. Biol. Chem.*, **178**, 53 (1949)
7. W. E. Cohn, *Science* **109**, 377 (1949); *J. Amer. Chem. Soc.*, **72**, 1471 (1950)
8. G. W. E. Plant, S. A. Kurby and H. A. Landy, *J. Biol. Chem.*, **184**, 243 (1950)
9. R. M. S. Smellie and J. N. Davidson, *Biochem. J.*, **49**, XV, (1951)
10. H. T. Miles, H. M. Fales, *Anal. Chem.*, **34**, 860 (1962)
11. J. Macgee, *Federation. Proc.*, **23**, Abst 2575 (1964)
12. J. Macgee, *Anal. Biochem.*, **14**, 305 (1966)
13. R. L. Hancock, D. L. Coleman, *Anal. Biochem.*, **10**, 36 (1965)
14. R. L. Hancock, *J. Gas Chromatog.*, **4**, 363 (1966)
15. T. Hashizume, Y. Sasaki, *Anal. Biochem.*, **15**, 199 (1966)
16. Y. Sasaki, T. Hashizume, *Anal. Biochem.*, **16**, 1 (1966)
17. T. Hashizume, Y. Sasaki, *Anal. Biochem.*, **15**, 346 (1966)
18. T. Hashizume, Y. Sasaki, *Anal. Biochem.*, **21**, 316 (1967)
19. T. Hashizume, Y. Sasaki, *Protein Nucleic Acid Enzyme*, **13**, 735 (1968)
20. W. Gehrke and D. Ruyle, *J. Chromatog.*, **38**, 473 (1968)
21. W. Gehrke and D. B. Lakings, *J. Chromatog.*, **61** 54 (1971)
22. D. B. Lakings and C. W. Gehrke, *J. Chromatog.* **62**, 347 (1971)
23. H. Yuki, *et al.*, *Analytical part*. The 94th Annual meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, 1974

24. C. C. Sweeley, R. Bentley, M. Makita, and W. W. Welles, *J. Amer. Chem. Soc.*, **85**, 2497 (1963)
25. D. F., Zinkel M. B. Lathrop and L. C., Zank *J. Gas Chromatog.*, **6**, 158 (1968)
26. S. H. Langer, P. Pantages and I. Wender, *Chem. Ind.*, **1958**, 1664)
27. T. Luukkainen, W. J. A. Vanden Heuval, E. O. A. Hahti, E. C. Horning, *Biochem. Biophys. Acta.*, **52**, 599 (1961)
28. A. K. Ruhlmann and W. Giesecke, *Angew. Chem.* **73** 113 (1961)
29. I. Tomida, *Protein Nucleic Acid Enzyme*, **12**, 1069 (1967)
30. R. C. Mehrota B. C., Plant, *J. Indian Chem. Soc.*, **40**, 623 (1963)
31. J. L. Speier, *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 1003 (1952)
32. C. A. Burkhard, J. V. Schmits and R. E. Bwinett, *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 5957 (1953)
33. M. M. Sprung and L. S. Nelson, *J. Org. Chem.*, **20**, 1750 (1955)
34. M. M. Sprung, *J. Org. Chem.*, **23**, 58 (1958)
35. T. Nishimura and I. Iwai, *Chem. Pharm. Bull.*, **12**, 352 (1964)
36. C. W. Gerke, D. L. Stalling, and C.D. Ruyle, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **28**, 869 (1967)
37. W. Funasaka, "Modern Gas Chromatography" Vol. III, **1971**, p. 219, Hirokawa Publishing Company, Tokyo.
38. J. A. McCloskey, A. M. Lawson, K. Tsuboyama, P. M. Krueger, and R. N. Stillwell, *J. Amer. Chem. Soc.*, **90**, 4182 (1968)
39. E. Chargaff, E. Vischer, R. Doniger, C. Green, and F. Misani, *J. Biol. Chem.*, **177**, 405 (1949)
40. J. D. Smith, and R. Markham, *Biochem. J.*, **46**, 509 (1950)
41. G. R. Wyatt, *Biochem. J.*, **48**, 584 (1951)
42. J. Marmur, and P. Doty, *J. Mol. Biol.*, **5**, 109 (1962)
43. W. Guschlbauer, E. G. Richard, K. Buerling, A. Adams and J. R. Fresco, *Biochemistry*, **4**, 964, (1965)
44. A. Marshak and H. J. Vogel, *J. Biol. Chem.*, **189**, 597 (1951)
45. R. H. Hall, *J. Biolog. Chem.*, **237**, 2283, (1962)
46. B. Rudenko, *J. Chromatog. Scien.*, **10**, 230 (1972)
47. B. A. Rudenko, *Zh. Analit. Khim.* **23**, 341 (1968)
48. B. A. Rudenko, A. A. Noravyan and V. F. Kucherov, *Zh. Analit. Khim.*, **23**, 114 (1968)
49. L. P. Turner, *Analy. Biochem.*, **28**, 288 (1969)
50. S. G. Perry, *J. Gas Chromatog.*, **2**, 54 (1964)